

过表达 CD82 对植入期小鼠子宫内膜整合素 αV 、 $\beta 3$ 、E-cadherin 和 β -catenin 表达的影响

尉晓蔚¹, 谭冬梅², 张倩², 何通川³, 谭毅²

(1. 大连大学附属中山医院, 大连 116001; 2. 重庆医科大学实验动物中心, 重庆 400016;
3. 美国芝加哥大学分子肿瘤实验室)

【摘要】 目的 探讨 CD82 对着床窗口期小鼠子宫内膜上皮细胞内整合素 αV 、 $\beta 3$ 、E-cadherin 以及 β -catenin 蛋白表达的影响。方法 将构建的 CD82 腺病毒转染原代培养的小鼠子宫内膜上皮细胞。检测妊娠小鼠子宫内膜上皮细胞转染 CD82 腺病毒后, 细胞内整合素 αV 、 $\beta 3$ 、E-cadherin 和 β -catenin 的表达变化情况。结果 提取的上皮细胞纯度为 $(93.2 \pm 0.6)\%$ 。构建的 CD82 腺病毒转染效率达到 $(92.0 \pm 4.5)\%$, 转染原代培养的小鼠子宫内膜上皮细胞 24 h 后, RT-PCR 检测发现 CD82 基因表达明显升高。转染 48 h 后, Western blot 检测 CD82 蛋白水平明显升高。免疫细胞化学检测妊娠第 4 天的小鼠子宫内膜上皮细胞转染 CD82 腺病毒后, 整合素 αV 、 $\beta 3$ 以及 β -catenin 的表达较未转染组均有明显上升 ($P < 0.05$), 但 E-cadherin 的表达量无明显变化 ($P > 0.05$)。结论 胚胎植入前, CD82 可能影响小鼠子宫内膜上皮细胞内整合素 αV 、 $\beta 3$ 和 β -catenin 的蛋白表达。

【关键词】 CD82 基因; 重组腺病毒; 子宫内膜上皮细胞; 原代培养; 孕小鼠

【中图分类号】 Q95-33, Q492 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 03-0057-05

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2014.03.012

Effect of CD82 on the expression of integrin αV , $\beta 3$, E-cadherin and β -catenin in uterine epithelial cells in pregnant mice

WEI Xiao-Wei¹, TAN Dong-Mei², ZHANG Qian², HE Tong-Chuan³, TAN Yi^{2*}

(1. Affiliated Zhongshan Hospital of Dalian University, Dalian 116001, China;
2. Chongqing Medical University, Chongqing 400016; 3. Molecular Tumor Laboratory, Chicago University)

【Abstract】 Objective Uterine epithelial cells were isolated from pregnant mice and cultured in vitro, and examined the effect of CD82 on the expression of integrin αV , $\beta 3$, E-cadherin and β -catenin in the cells. **Methods** The uterine epithelial cells were primarily isolated from pregnant mouse uterus. The recombinant adenovirus containing mouse CD82 gene which had been constructed in our lab infected the uterine epithelial cells. Immunocytochemistry was used to detect the protein expressions of integrin αV , $\beta 3$, E-cadherin and β -catenin in the uterine epithelial cells, which were infected with CD82 adenovirus or not. **Results** 1. The purity of primary cultured cells was $(93.2 \pm 0.6)\%$. 2. The transfection efficiency of CD82 recombinant adenovirus was $(92 \pm 4.5)\%$. The adenoviral particles carrying CD82 gene indeed expressed CD82 gene and protein in the primary uterine epithelial cells after 24 hours or 48 hours. 3. The uterine epithelial cells of pregnant mice on d4 expressed integrin αV , $\beta 3$, E-cadherin and β -catenin. 4. In contrast to the control group, when CD82 adenovirus infected cells, the uterine epithelial cells of pregnant mice on d4 increased the expression of integrin αV , $\beta 3$ and β -catenin protein, had no significant changes of E-cadherin. **Conclusions** CD82 may have effect on the expression of integrin αV , $\beta 3$ and β -catenin in mouse uterine epithelial cells before implantation.

[基金项目] 国家自然科学基金(30470654); 重庆市自然科学基金(2009BB5409); 教育部博士点科研基金(20095503110006)。

[作者简介] 尉晓蔚(1983年-), 女, 助理研究员。研究方向: 胚胎着床的分子机制。E-mail: angelwei2003@163.com

[通讯作者] 谭毅(1966年-), 男, 教授, 研究员。研究方向: 胚胎着床和实验动物学。E-mail: tanyee66@hotmail.com

【Key words】 CD82 gene; Recombinant adenovirus; Uterine epithelial cells; Primary cell culture; Pregnant mice

胚胎着床是生殖的关键步骤,包括胚胎与子宫内膜的识别,黏附以及植入^[1]。首先,胚胎定位并黏附到接受态的子宫内膜上皮细胞表面,随后胚胎穿透子宫内膜表面,植入子宫内膜基质中,完成植入。子宫内膜从非接受态转变为接受态时,不仅形态发生变化,其表面还表达许多黏附分子及黏附相关分子,有利于胚胎着床的进行^[2]。

CD82 糖蛋白属于四次跨膜糖蛋白,在肿瘤转移、免疫应答、创伤愈合、胚胎着床等过程中发挥重要作用^[3]。CD82 作为肿瘤转移抑制因子,在子宫内膜癌、结肠癌、乳腺癌、膀胱癌以及宫颈癌等多种癌症中的表达明显降低甚至缺失,其机制可能是由于 CD82 可以抑制肿瘤转移和迁移^[4]。Gellersen 等^[5]发现胚胎滋养层细胞不表达 CD82,但是母胎界面的蜕膜细胞大量表达 CD82,提示 CD82 可能参与胚胎植入。我们的前期研究结果表明,CD82 在小鼠动情周期、早孕及假孕的子宫内膜中均有规律表达^[6,7]。胚胎植入的前提是胚胎与子宫内膜上皮细胞之间的相互黏附,然而 CD82 是否参与该黏附过程尚无报道。本实验室构建 CD82 腺病毒转染原代培养的小鼠子宫内膜上皮细胞。观察 CD82 蛋白高表达时,与黏附相关的整合素 αV 、 $\beta 3$ 、E-cadherin 和 β -catenin 四个因子的蛋白表达变化情况,从而寻找 CD82 在胚胎植入可能参与的信号通路和相关机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂

兔抗小鼠 CD82 抗体、小鼠抗小鼠角蛋白抗体、山羊抗小鼠波形蛋白抗体、兔抗小鼠 integrin αV 抗体、山羊抗小鼠 integrin $\beta 3$ 抗体、兔抗小鼠 E-cadherin 抗体、山羊抗小鼠 β -catenin 抗体均购自美国 Santa Cruz 公司。生物素化兔二抗、山羊二抗、小鼠二抗、链霉素亲和素-过氧化物酶复合物以及 DAB 显色试剂盒等均购自中国北京中山生物技术有限公司。293 细胞系购自美国 ATCC 细胞库。1640 培养基购自美国 Invitrogen 公司。胎牛血清购自美国 GIBCO 生物公司。Trypsin 购自美国 Sigma 公司。

1.1.2 实验动物

SPF 级 KM 小鼠,6 周龄,雌性,体重 18 ~ 20 g,购自重庆医科大学实验动物中心 [SCXK (渝) 2007 - 0001]。无菌手术在重庆医科大学实验动物中心

屏障动物实验设施进行 [SYXK (渝) 2007 - 0001]。所有实验操作程序均经过重庆医科大学动物使用管理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 小鼠子宫内膜上皮细胞的原代培养

将妊娠第 4 天的雌鼠分别处死后取子宫,去除子宫周围的结缔组织和脂肪。用 PBS 清洗子宫并将其纵向切开,内膜面朝上展平于培养皿中,加 0.5% trypsin 静置 2 h (4℃) 和 0.5 h (37℃)。之后,将子宫组织移入 15 mL 离心管内,反复吸打后弃去子宫组织,溶液经 1000 r/min 离心 10 min 后弃去上清液;底层的细胞悬液再加入含 10% 血清的培养基反复清洗 2 次后,以 1×10^6 /mL 浓度接种到 6 孔板内,37℃,5% CO₂ 培养箱中培养。

1.2.2 重组 CD82 腺病毒的扩增和提取

本实验室已经成功构建含小鼠 CD82 全基因的重组腺病毒^[8]。当 293 细胞至 80% 融合时,转染腺病毒原液。每 0.4 μ L 病毒原液 (6.5×10^{12} pfu/mL) 转染 5×10^5 细胞。在 37℃,5% CO₂ 孵箱中培养,约 48 h 后荧光显微镜下观察 RFP 表达情况,此时约 90% 的 293 细胞出现红色荧光,且部分细胞漂起。将 293 细胞轻轻吹打下来,1000 r/min,离心 5 min 弃上清液,用 150 μ L PBS 重悬,收集细胞并反复冻融提取病毒液。将所提取的病毒液再转染 293 细胞,以大量制备病毒液。

1.2.3 重组 CD82 腺病毒的病毒滴度测定

将多次转染制备的病毒液做不同比例稀释 (1:10⁴ ~ 1:10¹²),将 400 μ L 稀释液加至 293 细胞培养板 (24 孔板) 中,37℃,5% CO₂ 孵箱中培养 18 ~ 24 h 于荧光显微镜下计数 RFP 阳性细胞数。选择能转染的最高稀释倍数孔内细胞 (有荧光)。按下列公式计算病毒滴度:病毒滴度 = RFP 阳性细胞数 \times 病毒上清稀释倍数 (pfu/mL) / 0.4 mL。

1.2.4 CD82 腺病毒转染上皮细胞

妊娠 4d 的小鼠子宫内膜上皮细胞,接种于 10% 多聚赖氨酸包被的小玻片上,24 h 后转染扩增的 CD82 腺病毒。转染 48 h 后,荧光显微镜下观察红色荧光。计算转染效率。

1.2.5 RT-PCR

转染 24 h 后,Trizol 试剂制备总 RNA,具体操作按试剂操作说明书进行。经 A260/A280 的比值和电泳检测结果检测 RNA 的纯度,并计算 RNA 含量

(RNA $\mu\text{g}/\text{mL} = A 260 \times 40 \times$ 稀释倍数), 所得样品置于 -80°C 保存。两步法反转录成 cDNA。CD82 上游引物为上游引物: 5'-CAT AGA TCT ACC ATG GGG GCA GGC TGT GT-3'。下游引物为 5'-TCA GTC GAC TCA GTA CTT GGG GAC CTT GC-3'。PCR 反应条件为: 94°C 预变性 5 min, 94°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 扩增 28 个循环, 72°C 延伸 10 min。

1.2.6 Western blot

转染 48 h 后, 在冰上刮取贴壁生长的上皮细胞, 加入细胞裂解液, 提取细胞全蛋白。取 50 μg 细胞全蛋白, 进行 12% SDS-PAGE 电泳, 之后转 PVDF 膜, 一抗浓度 1:500, 二抗浓度 1:1500。HRP-ECL 化学发光法检测 CD82 蛋白水平。

1.2.7 免疫细胞化学

将原代提取到的上皮细胞, 爬片于 10% 多聚赖氨酸包被的无菌盖玻片上。妊娠第 4 天的上皮细胞, 待其单层形成后取出玻片; 转染腺病毒的妊娠第 4 天的上皮细胞, 取 80 μL CD82 腺病毒, 转染 48 h 后取出玻片。各组均按免疫细胞化学常规步骤进行操作。各种多克隆抗体按 1:200 稀释, 以 PBS 代替一抗作为阴性对照。试剂公司提供的阳性对照照片作为阳性对照。

1.3 统计学处理

每个实验重复 3 次, 结果均以均数 \pm 标准差表示。免疫组织化学使用 Image-Pro Plus 6.0 经软件进行分析。Lab works 4.60 软件进行分析处理, 以内参基因 GAPDH 为基准分析各条带的相对密度值。免疫细胞化学随机选择 5 个高倍视野观察细胞有无棕黄染色, 根据染色强度及范围分别计分。累计 0~1 分为阴性(-), 1~2 分为弱阳性(+), 2~3 分为阳性(++), 3~4 分为强阳性(+++)。结果是每张片子随机选择的 5 个高倍视野的平均值。组间差异使用 SPASS 13.0 软件中的单因素方差分析以及 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性, $P < 0.01$ 为差异有极显著性。

2 结果

2.1 小鼠子宫内膜上皮细胞的纯度鉴定

原代培养的小鼠子宫内膜上皮细胞排列紧密, 分界不清, 细胞核大而圆, 位于细胞中央。靠近集落中央的上皮细胞较小, 呈不规则形或多边形; 位于集落外周的细胞, 胞体较大, 呈立方或短柱状, 有些

细胞还围成腺体形态。采用上皮细胞特异的角蛋白抗体以及基质细胞特异的波形蛋白抗体对细胞进行免疫化学染色。角蛋白的阳性染色为棕色, 主要分布在胞质区域(图 1A); 阴性对照组的细胞质区域均无阳性反应(图 1B)。波形蛋白抗体组的细胞质区域均无阳性反应(图 1C); 显微镜下随机选择不同的区域, 计数不同区域内免疫染色阳性的细胞数和细胞总数, 然后计算其比值。统计结果显示, 提取的上皮细胞纯度为 $(93.2 \pm 0.6)\%$ 。(图 1 见彩插 11)。

2.2 重组 CD82 腺病毒的病毒滴度测定

以不同稀释度的重组腺病毒转染 293 细胞。在荧光显微镜下观察 RFP 的表达(图 2), 见 $1:10^5$ 和 $1:10^6$ 稀释孔内有较多细胞内有荧光, $1:10^4$ 稀释孔内几乎全部细胞内有荧光。而 $1:10^7$ 至 $1:10^9$ RFP 表达的细胞逐渐减少。测得腺病毒转染滴度为 2.2×10^8 pfu/mL。

2.3 子宫内膜上皮细胞 CD82 基因和蛋白的表达

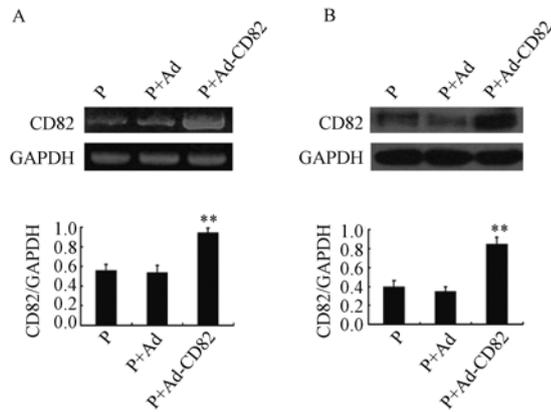
重组腺病毒转染小鼠子宫内膜上皮细胞 48 h 后, 免疫荧光检测发现转染效率达到 $(92.0 \pm 4.5)\%$ (图 2, 彩插 11)。RT-PCR 和 Western blot 检测 CD82 基因和蛋白的表达水平。结果发现, 重组 CD82 腺病毒组较对照组有明显的升高(图 3)。

2.4 免疫细胞化学结果

免疫细胞化学结果显示, CD82 蛋白表达于妊娠第 4 天的小鼠子宫内膜上皮细胞膜和细胞质。转染 CD82 腺病毒后, 上皮细胞强阳性表达 CD82 蛋白, 部分细胞的 CD82 蛋白甚至异位表达于细胞核内; 整合素 αV 、 β3 和 E-cadherin 表达于妊娠第 4 天的小鼠子宫内膜上皮细胞细胞膜和细胞质; β -catenin 蛋白表达于上皮细胞的细胞质; 与空腺病毒组比较, 转染 CD82 腺病毒的上皮细胞, 整合素 αV 、 β3 和 β -catenin 表达明显上升($P < 0.05$), E-cadherin 的表达量无明显变化($P > 0.05$)。各蛋白在小鼠子宫内膜上皮细胞的表达见图 4(彩插 12)。

3 讨论

CD82 广泛表达于各个组织中^[9]。CD82 的表达变化与不同的生理和病理过程相关。例如, CD82 表达水平的下降与子宫内膜癌、前列腺癌、结肠癌、肺癌、胰腺癌、乳腺癌以及卵巢癌等多种肿瘤的恶性转移程度呈正相关^[10]。CD82 的增加与增强细胞黏附密切相关^[11]。本实验室前期研究结果表明 CD82



注:A:转染 CD82 腺病毒 24 h 后,RT-PCR 检测 CD82 基因的表达;B:转染 CD82 腺病毒 48 h 后,Western blot 检测 CD82 蛋白的表达。P 组:妊娠第 4 天的小鼠子宫内膜上皮细胞;P + Ad 组:转染空腺病毒组;P + Ad-CD82 组:转染 CD82 腺病毒组。

图 3 CD82 转染小鼠子宫内膜上皮细胞后 CD82 基因和蛋白的表达

Note: A: RT-PCR analysis of expression of CD82 mRNA at 24 h after CD82 adenovirus transfection; B: Western blot detection of CD82 protein at 48 h after CD82 adenovirus transfection. Pregnant group: primary cultured uterine epithelial cells on day 4; P + Ad group: transfection with control adenovirus; P + Ad-CD82 group: transfection with CD82 adenovirus.

Fig. 3 Expression of CD82 in the mouse uterine epithelial cells after CD82 adenovirus transfection.

在小鼠动情周期、早孕及假孕子宫内膜中均有规律表达^[6,7]。另外,CD82 与 DARC 的相互作用抑制血管内皮细胞的转移^[12],暗示我们 CD82 可能在母胎界面发挥黏附分子的作用。已有报道发现,CD82 与其他 TM4SF 蛋白,或与整合素、E-cadherin 结合,在细胞表面形成复合物,介导同型或异型细胞间的黏附,从而抑制肿瘤细胞的运动和侵袭能力^[13,14]。

处于接受态的子宫内膜,其上皮细胞形态发生了一系列有利于胚胎植入的超微结构的变化^[15]。此外,在着床窗口期的子宫内膜上,许多分子表达水平的变化与其接受态的建立相关。黏附相关分子,例如粘蛋白和整合素,在着床窗口期的表达明显升高,参与子宫内膜接受态的建立^[16,17]。 $\alpha V \beta 3$ 在子宫内膜上皮周期特征性表达,窗口期整合素 $\alpha V \beta 3$ 等表达水平的增高,与内膜“着床窗”开放的时间相吻合,可作为子宫内膜容受性的标志^[18,19]。Ruseva 等^[20] 研究发现过表达 CD82 可以显著增加整合素 $\alpha V \beta 3$ /玻璃粘连蛋白-依赖的卵巢癌细胞的黏附。我们的结果发现 CD82 高表达可以明显增加整合素

αV 和 $\beta 3$ 的蛋白表达,提示我们 CD82 可能是整合素 αV 和 $\beta 3$ 的上游调控因子。

E-cadherin 介导细胞间相互聚集。E-cadherin 与 β -catenin 形成复合物后,在细胞内与细胞骨架的微丝系统相连。如果不能形成 E-cad/ β -cat 复合物,将导致上皮细胞之间的粘附力的下降或丧失。我们前期研究发现,CD82 在胚胎卵裂时可能与 E-钙黏素等细胞粘附分子结合,促进了胚胎的致密化,从而促进胚胎发育至囊胚^[21]。本实验免疫细胞化学显示,转染 CD82 腺病毒组和空腺病毒组,其 E-cadherin 表达没有统计学差异,说明 CD82 不能改变细胞水平的 E-cadherin,也不能改变 E-cadherin 的定位。但是转染 CD82 腺病毒后, β -catenin 蛋白出现明显的上调。推测 CD82 可能通过调节 β -catenin 的表达在 E-cad/ β -cat 复合物中发挥作用。

总之,我们认为胚胎植入前,小鼠子宫内膜上皮细胞内整合素 αV 、 $\beta 3$ 和 β -catenin 的表达可能受 CD82 的影响,为进一步研究 CD82 基因在胚胎着床中的作用奠定了基础。

(本文图 1,2 见彩插 11,图 4 见彩插 12。)

参 考 文 献

- [1] 陈系古,李智,俞生,等. 小鼠胚胎体外培养条件的研究 [J]. 中国实验动物学报, 1998, 6(1): 42-46.
- [2] 孙晓丽,刘雁峰,孙天琳,等. 女性月经周期相关表现及影响因素的研究概况 [J]. 中国医药导报, 2013, 10(18): 33-36.
- [3] Tsai YC, Weissman AM. Dissecting the diverse functions of the metastasis suppressor CD82/KAI1 [J]. FEBS Lett. 2011, 585(20):3166-3173.
- [4] Malik FA, Sanders AJ, Jiang WG. KAI-1/CD82, the molecule and clinical implication in cancer and cancer metastasis [J]. Histol Histopathol. 2009, 24(4):519-530.
- [5] Gellersen B, Briese J, Oberndörfer M, et al. Expression of the metastasis suppressor KAI1 in decidual cells at the human maternal-fetal interface; Regulation and functional implications [J]. Am J Pathol. 2007, 170:126-139.
- [6] 王焕英,谭冬梅,何明忠,等. 肿瘤转移抑制因子 CD82/KAI1 基因在小鼠子宫内膜的动态表达 [J]. 生殖与避孕, 2007, 27(1):16-20.
- [7] 谭冬梅,赵邦霞,尉晓蔚,等. 肿瘤转移抑制因子 CD82/KAI1 在假孕小鼠子宫的表达及其对小鼠胚胎着床的影响 [J]. 生殖与避孕, 2007, 27(9):567-572.
- [8] 尉晓蔚,张倩,谭冬梅,等. 重组腺病毒 CD82/KAI1 对小鼠子宫基质细胞内 αV 、 $\beta 3$ 、MMP-9、E-cadherin 和 β -catenin 蛋白表达的影响 [J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(7): 572-576.
- [9] Liu WM, Zhang XA. KAI1/CD82, a tumor metastasis suppres-

- sor [J]. *Cancer Lett.* 2006, 40:183 - 194.
- [10] Tonoli H, Barrett JC. CD82 metastasis suppressor gene: a potential target for new therapeutics? [J]. *Trends Mol Med.* 2005, 11:563 - 570.
- [11] Wright MD, Moseley GW, van Spruel AB. Tetraspanin microdomains in immune cell signalling and malignant disease [J]. *Tissue Antigens.* 2004, 64:533 - 542.
- [12] Bandyopadhyay S, Zhan R, Chaudhuri A, et al. Interaction of KAI1 on tumor cells with DARC on vascular endothelium leads to metastasis suppression [J]. *Nat Med.* 2006, 12:933 - 938.
- [13] Liu WM, Zhang F, Moshiah S, et al. Tetraspanin CD82 inhibits protrusion and retraction in cell movement by attenuating the plasma membrane-dependent actin organization [J]. *PLoS One.* 2012, 7(12):e51797. doi: 10.1371/journal.pone.0051797. Epub 2012 Dec 14.
- [14] 刘静, 杨桂芳, 龚玲玲, 等. KAI1/CD82 和 E 钙黏着糖蛋白及整合素 $\beta 1$ 表达与胃癌侵袭转移的关系 [J]. *中华病理学杂志*, 2007, 36(8):558 - 559.
- [15] 谭毅, 顾美礼, 王智彪, 等. 完整分离围床期小鼠子宫内膜方法的建立 [J]. *中国实验动物学报*, 2001, 9(1): 40 - 44.
- [16] Cavagna M, Mantese JC. Biomarkers of endometrial receptivity — a review [J]. *Placenta.* 2003, 24:39 - 47.
- [17] Tranguch S, Daikoku T, Guo Y, et al. Molecular complexity in establishing uterine receptivity and implantation [J]. *Cell Mol Life Sci.* 2005, 62:1964 - 1973.
- [18] Casals G, Ordi J, Creus M, et al. Osteopontin and alphavbeta3 integrin expression in the endometrium of infertile and fertile women [J]. *Reprod Biomed Online.* 2008, 16:808 - 816.
- [19] Casals G, Ordi J, Creus M, et al. Osteopontin and alphavbeta3 integrin as markers of endometrial receptivity: the effect of different hormone therapies [J]. *Reprod Biomed Online.* 2010, 21: 349 - 359.
- [20] Ruseva Z, Geiger PX, Hutzler P, et al. Tumor suppressor KAI1 affects integrin alphavbeta3-mediated ovarian cancer cell adhesion, motility, and proliferation [J]. *Exp Cell Res.* 2009, 315: 1759 - 1771.
- [21] 赵邦霞, 谭冬梅, 尉晓蔚, 等. 肿瘤转移抑制因子 CD82/KAI1 对植入前小鼠胚胎体外发育的影响 [J]. *生殖与避孕*, 2008, 28(10):582 - 587.

[收稿日期] 2014-01-20

(上接第 56 页)

- [4] 卢天罡. 小鼠休眠胚胎的冷冻研究 [D]. 北京农学院硕士论文, 2008.
- [5] Lopes FL, Desmarais JA, Murphy BD, et al. Embryonic diapause and its regulation [J]. *Reproduction*, 2004, 128:669 - 678.
- [6] Spindler R, Renfree M, Gardner D. Carbohydrate uptake by quiescent and reactivated mouse blastocysts [J]. *J Exp Zool.* 1996, 276(2):132 - 137.
- [7] Given RL, Weitlauf HM. Resumption of DNA synthesis during activation of delayed implanting mouse blastocysts [J]. *Exp Zool.* 1981, 218:253 - 259.
- [8] Sherwin, JR, Freeman TC, Stephens RJ, et al. Identification of genes regulated by leukemia-inhibitory factor in the mouse uterus at the time of implantation [J]. *Mol Endocrinol.* 2004, 18(9): 2185 - 2195.
- [9] Dey, SK, Lim H, Reeze J, et al. Molecular cues to implantation [J]. *Endocr Rev.* 2004, 25(3):341 - 373.
- [10] Lopes FL, Desmarais JA, Murphy BD, et al. Embryonic diapause and its regulation [J]. *Reproduction*, 2004, 128:669 - 678.
- [11] Enders RK. Reproduction in the mink (*Mustela vison*) [J]. *Proc Am Phil Soc.* 1952, 96(6):691 - 755.
- [12] Enders AC, Schlafke S, Hubbard NE, et al. Morphological changes in the blastocyst of the western spotted skunk during activation from delayed implantation [J]. *Biol Reprod.* 1986, 34(2):423 - 437.
- [13] Wang H, Matsumoto H, Guo Y, et al. Differential G protein-coupled cannabinoid receptor signaling by anandamide directs blastocyst activation for implantation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003, 100(25):14914 - 14919.
- [14] Calarco PG, Brown EH. An ultrastructural and cytological study of preimplantation development of the mouse [J]. *Exp Zool.* 1969, 171: 253 - 284.
- [15] Hillman N, Tasca RJ. Ultrastructural and autoradiographic studies of mouse cleavage stages [J]. *Am J Anat.* 1969, 126:151 - 174.
- [16] Wu JT, Meyer RK. Ultrastructural changes in the delayed implanting rat blastocyst, following estrogen administration [C]. Abstract, presented at the Third Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, September 9-11, 1970. at the Ohio State University, Columbus.
- [17] Meeusen S, McCaffery JM, Nunnari J. Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro [J]. *Science.* 2004, 305(5691): 1747 - 1752.
- [18] Berdanier CD, Ecerts HB. Mitochondrial DNA in aging and degenerative disease. *Mutat Res* [J]. 2001, 475(1-2):169 - 183.

[收稿日期] 2014-03-19